

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 5–13

Die Bestimmung der Glucose in Plasma und Serum (Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode) mit dem Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II

Von R. Richterich†, H. Küffer, Erica Lorenz und J. P. Colombo

Chemisches Zentrallabor, Inselspital Bern, Schweiz

(Eingegangen am 5. Oktober/26. November 1973)

1. Die Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode wurde für den Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II adaptiert. Durch Weglassen der Enzyme im Leerwert-Ansatz wird ein Proben- und partieller Reagenzien-Leerwert mitgeführt.
2. Der lineare Meßbereich liegt zwischen 0 und 500 mg/100 ml (0–28 mmol/l).
3. Eine Verschleppung ist bei einem Konzentrations-Gefälle von 200 auf 12 mg/100 ml nicht nachweisbar.
4. Alle untersuchten potentiellen Stör-Faktoren, inklusive Lipämie, Hämolyse, Bilirubin, Fructose und Mannose gaben negative Resultate.
5. Die Präzision ist eine Funktion der Absorbanz: der Variations-Koeffizient fällt von unendlich bei einer Absorbanz von Null auf 2% bei einem A von 0,05, 1% bei einem A von 0,10 und stabilisiert sich auf 0,5% bei einer Absorbanz über 0,20.
6. Die Konstanz der Volumina, Zeiten und Temperaturen erlaubt eine Absolut-Messung ohne Eichung über mehr als 8 Monate (bisherige Erfahrung). Die Stabilität der Reagenzien ist ausgezeichnet.
7. Die Reproduzierbarkeit ist gleich der Repetierbarkeit und ist durch die apparative und methodische Präzision gegeben.

The determination of glucose in plasma and serum (hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method) with the Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II

1. The hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method was adapted for the Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II. A sample blank and a partial reagent blank were performed by omitting the enzymes in the reagent control sample.
2. The assay is linear between 0 and 500 mg/100 ml (0–28 mmol/l).
3. Carry over could not be detected after a change in concentration from 200 to 12 mg/100 ml between neighbouring samples.
4. All the investigated potential sources of interference, including lipaemia, haemolysis, bilirubin, fructose and mannose, had no effect.
5. The precision is a function of absorbance: the variation coefficient falls from infinity at an absorbance of zero, to 2% at an absorbance of 0.05, 1% at 0.1, and it stabilizes at 0.5% at absorbances greater than 0.20.
6. With controlled constant volumes, times and temperatures, absolute determinations can be performed over 8 months (based on experience so far) without calibration.
7. The reproducibility is the same as repeatability, and is a function of the apparative and methodical precision.

Die Hexokinase¹⁾/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase²⁾ Methode (Hexokinase-Methode) gilt heute als Referenz-Methode für die Bestimmung der Glucose in biologischen Flüssigkeiten. Das Prinzip dieses Verfahrens wurde zuerst von Cori et al. (1) zur Messung der Hexokinase-Aktivität verwendet. Die ersten Glucose-Bestimmungen führten Hohorst et al. (2) in Leber-Gewebe durch. Schmidt (3) verwendete das Verfahren in der Klinik zur gleichzeitigen Messung der Glucose- und Fructose-Konzentration im Serum. Czok und Bartelmai (4) führten die ersten Routine-Bestimmungen von Blut, Liquor und Urin nach Enteiweißung mit Perchlorsäure durch. Spätere Modifikationen erlaubten eine direkte Verwendung von verdünntem Hämolyt (5–7). In unseren Laboratorien wird die Glucose seit über drei Jahren direkt, d. h. ohne vorgängige Enteiweißung mit der

Hexokinase-Methode bestimmt (8, 9). Die Methode hat sich auch als besonders geeignet für die Bestimmung der Glucose im Urin erwiesen (10–15).

Die Hexokinase-Methode wurde zuerst von Scherstén und Tibbling (16) zur Glucose-Bestimmung im Urin mechanisiert: sie führten die Bestimmung fluorometrisch auf einem AutoAnalyzer (Technicon) durch. Photometrische Adaptationen für den AutoAnalyzer wurden von Harding und Heinzl (17), Yee (18) und Neeley (19) beschrieben. Vor kurzem berichteten Haeckel und Haeckel (20) über eine Adaptation der Methode für den Eppendorf 5030 Automaten zur Bestimmung der Glucose in enteiweißtem Blut. Schmidt et al. (21) verwendeten das Verfahren im Analysen-Automaten C4B (Perkin-Elmer).

Wir berichten in der vorliegenden Arbeit über die Adaptation einer Hexokinase-Methode für den Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II (GSA II) (22). Diese Methode eignet sich vor allem für die Bestim-

¹⁾ EC 2.7.1.1

²⁾ EC 1.1.1.49

mung der Glucose in Plasma, Serum, Liquor und Urin. In einer späteren Arbeit werden wir eine Modifikation beschreiben, die für die Bestimmung der Glucose in Kapillar-Blut und Kapillar-Plasma besonders geeignet ist.

Material und Methoden

Chemikalien

Äthylendiamin-tetraessigsäure, Dinatrium-Salz, Di-Hydrat (EDTA) (puriss., Fluka Nr. 03670)
 Ammoniumsulfat (puriss., p. a., Fluka Nr. 09980)
 ATP, Dinatrium-Salz, Tri-Hydrat (Boehringer Nr. 15028, 1-g-Packung)
 Glucose (Standard Reference Material, National Bureau of Standards, purity 99,9%)
 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (etwa 170 U/mg, Suspension in 3,2 mol/l Ammoniumsulfat-Lösung, Boehringer Nr. 15303, 5-mg-Packung)
 Hexokinase (etwa 140 U/mg, Suspension in 3,2 mol/l Ammoniumsulfat-Lösung, Boehringer Nr. 15431, 10-mg-Packung)
 Magnesiumsulfat, Hepta-Hydrat (puriss., p. a., Fluka Nr. 63140)
 NADP, Dinatrium-Salz (Boehringer Nr. 15600, 500-mg-Packung)
 Nicotinsäureamid (pur., Fluka Nr. 72340)
 Triäthanolamin-hydrochlorid (puriss., p. a., Fluka Nr. 90290)

Stamm-Lösungen

Puffer-Lösung

(Konzentrationen in mmol/l: EDTA 10, Magnesiumsulfat 40,6, Nicotinsäureamid 9,83, Triäthanolamin-Salzsäure-Puffer 600, pH 7,5): 55,7 g Triäthanolamin-hydrochlorid und 1,86 g EDTA werden mit demineralisiertem Wasser auf etwa 400 ml gelöst. 5,0 g Magnesiumsulfat und 600 mg Nicotinsäureamid zugeben und lösen. pH auf 7,5 einstellen und mit demineralisiertem Wasser auf 500 ml auffüllen. Bei 4° C mindestens 1 Jahr haltbar.

Ammoniumsulfat-Lösung

(Ammoniumsulfat 250 mmol/l): 33 g Ammonium-Sulfat in etwa 800 ml demineralisiertem Wasser lösen und auf 1 Liter auffüllen. Unbeschränkt haltbar.

Gebrauchs-Lösungen

R-1: Substrat-Reagenz

(Konzentrationen, mmol/l: ATP 1,65, EDTA 5,0, Magnesium-Sulfat 20,3, NADP 0,635, Nicotinsäureamid 4,91, Triäthanolamin-Salzsäure-Puffer 300, pH 7,5): 1 g ATP (1 Packung) und 500 mg NADP (1 Packung) in 500 ml Puffer-Lösung lösen und mit demineralisiertem Wasser auf 1 Liter auffüllen. Im GSA II mindestens 1 Monat haltbar.

R-2: Enzym-Reagenz

(Konzentrationen, mmol/l: Ammonium-Sulfat 250, Hexokinase 50 mg/l (> 700 U/l), Hexokinase 200 mg/l (> 28000 U/l)). 20 mg Hexokinase (2 Packungen) und 5 mg Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1 Packung) werden mit Ammoniumsulfat-Lösung auf 100 ml gelöst. Im GSA II mindestens 1 Monat haltbar.

R-3: Leerwert-Reagenz

(Konzentration: Ammoniumsulfat 250 mmol/l). Ammoniumsulfat-Lösung direkt verwenden. Im GSA II mindestens 1 Monat haltbar.

Bestimmung der Glucose-Konzentration mit dem GSA II

Alle vorliegenden Untersuchungen wurden mit einem Serienmodell des GSA II (22–24) durchgeführt.

Beschreibung der Methode C GL 1

Die Abkürzung C GL 1 steht für: Chemie, Glucose, Methode 1 (25). Das Vorgehen bei dieser Methode ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Beim GSA II werden stets zwei Ansätze, ein Proben-Ansatz (S, sample assay) und ein Leerwert-Ansatz (B, blank assay) in einem Paar von Prozeß-Gefäßen (I und II) durchgeführt. Da aus programmatischen Gründen die Absorbanz in Ansatz I kleiner als in Ansatz II sein muß und bei der Hexokinase-Methode eine Absorbanz-Zunahme erfolgt, wird Ansatz I als Leerwert (B) und Ansatz II als Proben-Ansatz (S) gewählt. Bei der vorliegenden Methode wird ein Proben- und partieller Reagenzien-Leerwert durchgeführt, d. h. es werden im Leerwert-Ansatz (Prozeß-Gefäß I) die Enzyme weggelassen. Die einzelnen Reagenz-Volumina und das Timing der Reagenzien-Zugabe sind in Abbildung 1 dargestellt.

	REAGENT	DISPENSER		VOLUME		TUBE	
		sec	nr	I	II	I	II
	S+DF (20+100)	594/600	99/100	120	120	■	■
	DF (120)	582	97	—	—	■	■
R-1	Substrate Reagent	528	88	1600	1600	■	■
R-2	Enzyme Reagent	498	83	—	200	■	■
R-3	Blank Reagent	336	56	200	—	■	■
R-4						■	■

Fig. 1. Beschreibung der Methode C GL 1.

Methoden-Programmierung

Abbildung 2 zeigt schematisch die Methoden-Programmierung auf dem Programm-Panel. Eine ausführliche Erläuterung haben wir bereits früher gegeben (22, 26).

Meß-Bedingungen

Im Ansatz I (B) liegen folgende End-Konzentrationen vor (mmol/l): Ammonium-Sulfat 26,0, ATP 1,38, EDTA 4,17, Magnesiumsulfat 16,9, NADP 0,529, Nicotinsäureamid 4,09, Triäthanolamin-Salzsäure-Puffer 250, pH 7,5. In Ansatz II (S) kommen zusätzlich dazu: Hexokinase 5,20 mg/l (> 700 U/l) und Hexokinase 20,0 mg/l (> 2800 U/l). Die Glucose-Konzentration im linearen Meß-Bereich liegt zwischen 0 und 0,230 mmol/l. Die Minimal-Zeiten für die einzelnen Reaktions-Schritte betragen: R-1 > 324 s (z. B. 534 s), R-2 > 300 s (z. B. 498 s) und R-3 > 48 s (z. B. 336 s).

Konstanten

ϵ (NADPH, 366 nm)	= 3300 cm ² /mmol
MG (Glucose)	= 180,16
Proben-Volumen (SV, sample volume)	= 20 μ l
End-Volumen (FV, final volume)	= 1920 μ l

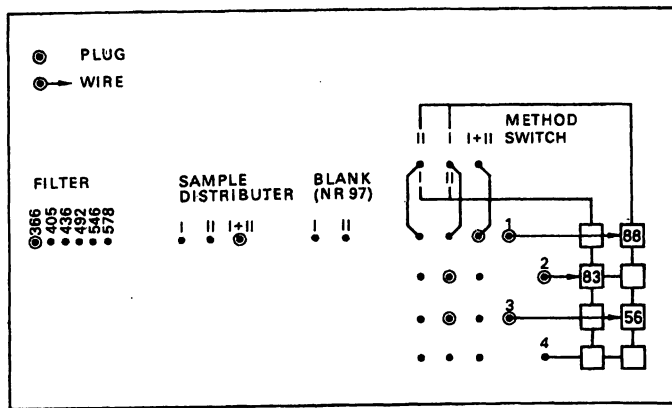


Fig. 2. Programmierung der Methode C GL 1.

Berechnungen

1. S. I. Einheit

$$c = dA \cdot \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{FV}{SV} \cdot 1000 \text{ mmol/l}$$

$$c = dA \cdot 29,09$$

$$k \text{ (Methoden-Print)} = 2909$$

$$n \text{ (Zahl der Stellen nach dem Komma)} = 2$$

2. Konventionelle Einheit

$$c = dA \cdot \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{MG}{10} \cdot \frac{FV}{SV} \cdot 1000 \text{ mg/100 ml}$$

$$c = dA \cdot 524 \text{ mg/100 ml}$$

$$k = 0524$$

$$n = 0$$

Resultate und Diskussionen

Zur Reaktions-Kinetik

Bei enzymatischen Methoden der vorliegenden Art ist der lineare Meß-Bereich durch drei Faktoren-Gruppen bestimmt:

1. der Konzentration und den K_m der verwendeten Hilfs- und Indikator-Enzyme,
2. der Konzentration der Substrate und Coenzyme, d. h. im vorliegenden Fall des ATP und des NADP und
3. den Reaktions-Bedingungen, d. h. der Inkubations-Dauer und der Inkubations-Temperatur.

Maßgebend für die Wahl der Meß-Bedingungen ist der gewünschte lineare Meß-Bereich. Wir setzten uns zum Ziel die Methode so zu konzipieren, daß bis zu einer Glucose-Konzentration von 500 mg/100 ml eine lineare Beziehung zwischen Absorbanz und Konzentration vorliegt. Von den oben angeführten Faktoren sind der K_m der Hexokinase und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gegeben. Die beim GSA II vorliegende Inkubations-Temperatur von 37°C erlaubt einen raschen Reaktionsablauf. Die für den gewünschten Meß-Bereich optimalen Enzym- und ATP-Konzentrationen wurden bereits

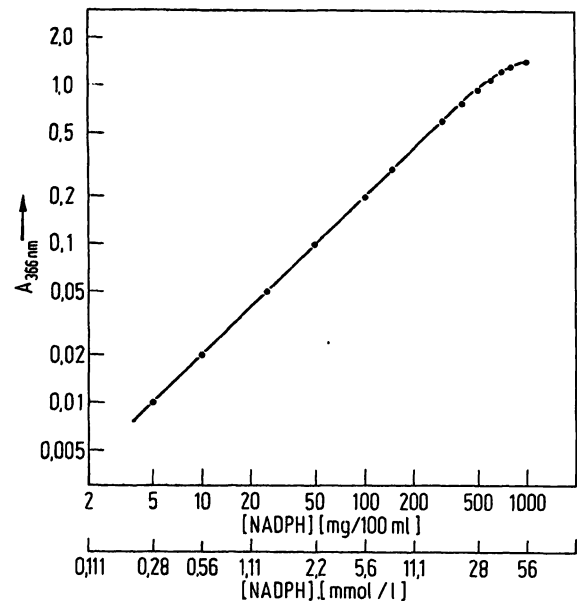


Fig. 3. Linearer Meß-Bereich bei der Bestimmung der Glucose. Die obere Grenze der Linearität ist durch die Konzentration des NADPH limitiert.

früher für eine ähnliche manuelle Methode ermittelt (8, 15) und für den GSA II übernommen. Unter diesen Bedingungen wird die Konzentration des NADP zum limitierenden Faktor. Wir wählten beim NADP eine End-Konzentration von 0,673 mmol/l. Da die Probe im Ansatz 96fach verdünnt vorliegt, entspricht dies einer theoretisch maximal meßbaren Glucose-Konzentration von 65 mmol/l (1170 mg/100 ml) (Abb. 3). Die praktische Erfahrung hat gezeigt, daß unter diesen Voraussetzungen bei einer Inkubationsdauer über 6 min eine lineare Beziehung zwischen Absorbanz und Konzentration vorliegt und zwar bis etwa die Hälfte des vorhandenen NADP umgesetzt ist. Liegt der Großteil der Resultate bei den Glucose-Bestimmungen unter 250 mg/100 ml, so können die NADP- und Enzym-Konzentrationen auf die Hälfte reduziert werden. Dies mag z. B. bei Screening-Untersuchungen zweckmäßig sein, bei denen eine Linearität bis zu 250 mg/100 ml vollauf genügt. In jedem Fall kann durch eine Vorverdünnung von 1 + 9 der Linearitäts-Bereich um einen Faktor von 10 vergrößert werden.

Optische Eigenschaften des Reaktions-Produktes

Für die folgenden Untersuchungen wurde Referenz-Material des National Bureau of Standards verwendet. Zum Vergleich wurden auch kommerzielle Eich-Lösungen (Preciset, Boehringer) mitgeführt. Eine typische Versuchsreihe ist in Tabelle 1 dargestellt. Es liegt eine lineare Beziehung zwischen Absorbanz und Glucose-Konzentration im Bereich von Null bis 500 mg/100 ml (etwa 27,5 mmol/l) vor. Eine Berechnung der Regression in diesem Meßbereich ergab

$$c = 0,0014 + 29,090 \text{ dA mmol/l.}$$

Tab. 1. Bestimmung der Glucose-Konzentration in wäßrigen Lösungen. Bei jeder Konzentration wurden 10 Bestimmungen durchgeführt

Sollwerte (Einwaage)	Gefunden			Absorbanz		
mg/100 ml	mg/100 ml	%	mmol/l	\bar{x}	s	V. K. (%)
0 0,00	0,1			0,0034	0,00122	35,88
25,5	27,7	108,6	1,54	0,0529	0,00181	3,42
51,0	51,9	101,8	2,88	0,0990	0,00108	1,09
102,0	104,2	102,2	5,78	0,1987	0,00108	1,09
153,0	154,3	100,8	8,57	0,2946	0,00202	0,69
204,0	205,7	100,8	11,42	0,3923	0,00221	0,56
306,0	310,6	101,5	17,24	0,5926	0,00314	0,53
408,0	406,6	99,7	22,58	0,7762	0,00314	0,28
510,0	501,0	98,3	27,82	0,9563	0,00242	0,25
561,0	544,1	96,9	30,20	1,0495	0,00413	0,40
612,0	588,0	96,1	32,64	1,1122	0,00402	0,36
714,0	655,6	91,8	36,39	1,2509	0,00618	0,49
816,0	706,2	86,5	39,20	1,3475	0,00457	0,34
1020,0	765,9	75,1	42,52	1,4617	0,00190	0,13

Die Standard-Abweichung betrug 0,00270 mg/100 ml, der Korrelations-Koeffizient 1,0 (6 Stellen). a weicht nicht von Null ab. Die Größe von b ist im vorliegenden Fall mit demjenigen des Methoden-Faktors (29,09) identisch. Die Ursache der bei diesem Versuch systematischen Abweichung bei den tiefen Glucose-Konzentrationen konnten wir nicht eruieren. Es handelt sich dabei nicht um eine konstante Beobachtung. Ähnliche Erfahrungen machten wir auch mit Preciset (Boehringer). Die gefundenen Werte lagen hier zwischen 99,7 und 101,7%, im Mittel 100,63% der deklarierten Werte.

Bei der Entwicklung dieser Methode gingen wir von einer molaren Absorptivität des NADPH bei 366 nm von 3300 cm²/mmol aus (27–29).

Tab. 2. Bestimmung der Glucose-Konzentration in Preciset (Boehringer) Resultate in mg/100 ml (N = 10)

Sollwerte	Gefundene Werte			
	\bar{x}	%	s	V. K.
50	50,20	100,4	1,135	2,26
100	101,70	101,7	1,767	1,74
150	149,50	99,7	0,850	0,57
200	202,60	101,3	1,506	0,74
300	302,20	100,7	1,398	0,46
400	400,00	100,0	1,633	0,41

Auf Grund unserer Erfahrungen stimmen die durch Einwägen erhaltenen Werte sehr gut mit diesen Angaben in der Literatur überein. Die von zwei Seiten (7,20) geäußerten Kritiken, wonach mit dieser molaren Absorptivität im Vergleich zu derjenigen bei 334 nm um 3–4% zu hohe Werte erhalten werden, können wir nicht bestätigen; wir vermuten vielmehr, daß optische Faktoren (Streulicht?) für die beobachteten Diskrepanzen verantwortlich waren. Es scheint uns jedoch außerordentlich wichtig, daß diese Unstimmigkeiten geklärt werden, da die molare Absorptivität des NADPH ein Basiswert der Enzymologie und Klinischen Chemie ist.

Zur Wahl der Leerwerte

Bei korrekter Durchführung der manuellen Hexokinase-Methode muß entweder enteiweißt (4) oder aber ein Proben- und partieller Reagenzien-Leerwert mitgeführt werden (8, 15). Von einer direkten Bestimmung ohne Leerwert in Plasma oder Serum ist auf jeden Fall abzuraten, da sich im Plasma zahlreiche im Ultravioletten absorbierende Substanzen finden. Selbst die Verwendung der üblichen Enteiweißungsmittel, Perchlorsäure und Trichloressigsäure, scheint heute fraglich geworden zu sein (20), da sich offenbar die durch diese Säuren nicht präzipitierten Glycoproteine (Seromucoid, α -Glycoprotein, Haptoglobine) störend auswirken können.

Bei den bisher gebräuchlichen Analysatoren ist das Leerwert-Problem unterschiedlich gelöst. Beim Auto-Analyzer werden offenbar durch die Dialyse der größte Teil der interferierenden Substanzen eliminiert (18,19). Für den C 4 B (Perkin–Elmer) wird die Verwendung eines Leerwert-Kanals empfohlen (21). Beim Endpunkt-Automaten 5030 (Eppendorf) müssen entweder die Leerwerte separat analysiert werden oder aber eine Enteiweißung mit Zinkhydroxid vorgenommen werden (20).

Das Konzept des GSA II fordert bei jeder Bestimmung das Mitführen eines Leerwertes. Im vorliegenden Fall drängt sich – analog der manuellen Methode (8) – das Weglassen der Hexokinase und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bei sonst identischen Konzentrationen im Leerwert-Ansatz auf. Diese beiden Enzyme weisen in den eingesetzten Konzentrationen bei 366 nm keine Absorbanz auf. Wir führen somit einen Proben- und partiellen Reagenzien-Leerwert durch.

Spezifität

Selektivität

Theoretisch ist die Hexokinase-Methode absolut selektiv. Da neben Glucose aber auch Fructose und Mannose

durch Hexokinase phosphoryliert werden, besteht die Gefahr, daß bei der Verwendung unreiner Enzyme diese Hexose-Phosphate durch die entsprechenden Isomerasen in Glucose-6-Phosphat umgewandelt werden (3, 12–14). Solchen theoretischen Erwägungen, die offenbar auf der Verwendung relativ unreiner Enzyme beruhen, stehen aber die praktischen Erfahrungen gegenüber. Nur bei sehr hohen Fructose-Konzentrationen soll tatsächlich mit einer Störung zu rechnen sein: so sollen 360 mg/100 ml (20 mmol/l) Fructose eine scheinbare Glucose-Konzentration von 9,5 mg/100 ml (0,53 mmol/l) vortäuschen. Von anderer Seite (13, 14) wurde bei hohen Fructose-Konzentrationen nicht eine positive, sondern eine negative Interferenz beobachtet, die durch eine Kompetition um die Hexokinase gedeutet wurde.

Da die Möglichkeit einer Interferenz vor allem von der Reinheit der Enzyme, sowie der Konzentration der Enzyme, des NADP und des ATP's abhängig ist, führten wir einige Experimente durch. Es wurden je eine wäßrige Lösung von Glucose mit etwa 100 mg/100 ml und Fructose, bzw. Mannose mit je 10 g/100 ml hergestellt. Durch Misch-Versuche wurden der Einfluß der Fructose und der Mannose auf die Messung der vorliegenden Glucose untersucht. Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß unter den vorliegenden Bedingungen Fructose in Konzentrationen über 1g/100 ml einen geringen positiven Effekt hat, der aber selbst bei 5 g/100 ml den gemessenen Glucose-Wert um weniger als 10% erhöht. Bei der Mannose ließ sich bis zu Konzentrationen von 5 g/100 ml überhaupt kein Einfluß nachweisen. Die Hexokinase-Methode muß daher in der vorliegenden Modifikation als absolut selektiv gelten.

Tab. 3. Einfluß von Fructose und Mannose auf die Glucose-Bestimmung (N = 6). Alle Resultate in mg/100 ml. Die Fructose und Mannose wurde in verschiedenen Mengen in das gleiche Serum eingewogen.

Zusatz (Fructose, bzw. Mannose)	Glucose-Konzentration			
	Fructose		Mannose	
	\bar{X}	s	\bar{X}	s
0	96,2	0,79	95,6	1,43
500	96,3	1,25	96,4	1,30
1000	96,8	1,93	96,1	0,99
2000	99,6	1,26	96,5	1,08
3000	100,4	0,97	97,5	0,97
4000	102,4	0,97	97,2	1,55
5000	104,2	0,92	98,9	0,99

Chemische Interferenzen

Über potentielle chemische Stör-Faktoren bei der Hexokinase-Methode liegen mehrere Untersuchungen vor (4, 5, 12–15, 18–20). Außer den erwähnten fragwürdigen Störungen durch Fructose und Mannose geben alle Untersuchungen Zucker (Arabinose, Ascorbinsäure,

Dextrane, Galactose, Glucuronsäure, Inositol, Lactose, Maltose, Mannose, Rhamnose, Ribose, Saccharose, Xylose u. a.) keine Störungen. Ebenfalls negativ verliefen Interferenz-Versuche mit verschiedenen Metaboliten (Creatinin, Fumarsäure, Glutathion, Harnsäure, Phosphat u. a.) und Medikamenten (*p*-Amino-Hippurat, Ampicillin, *L*-DOPA, Tetracycline, Tolazamid, Tolbutamid, u. a.). Negative Resultate wurden auch mit den üblichen Glycolyse-Hemmern (Fluorid, Monojodacetat) und Antikoagulantien (Heparin, Oxalat, EDTA) erhalten.

Das Fehlen eines Einflusses einer Hämolyse (18, 19) schien uns überprüfenswert, da immerhin damit gerechnet werden könnte, daß das entstehende 6-Phospho-Gluconat durch erythrocytäre 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase³⁾ weiter umgesetzt wird (6). Ein Zusatz von frisch hergestelltem Hämolyt zu einem glucose-haltigen Plasma ergab jedoch, wie aus Tabelle 4 hervorgeht, keine Beeinflussung des gemessenen Resultates. Auch mit Bilirubin (Tab. 5) konnte, wie bereits früher beobachtet wurde (18, 19), keine Störung beobachtet werden.

Tab. 4. Einfluß einer Hämolyse auf die Glucose-Bestimmung (N = 5)

Hämoglobin-Konzentration		Glucose-Konzentration			
mmol/l	mg/100 ml	mmol/l			mg/100 ml
		\bar{X}	s	V. K. (%)	
0	0	6,306	0,0633	1,004	113,6
12,4	20	6,317	0,8367	0,046	113,8
19,9	32	6,284	0,0464	0,739	113,2
24,8	40	6,317	0,0464	0,735	113,8
47,2	76	6,273	0,0393	0,626	113,0
70,1	113	6,306	0,0633	1,004	113,6
93,7	151	6,273	0,0556	0,885	113,0
117	188	6,273	0,0393	0,626	113,0
174	281	6,217	0,0607	1,094	112,0
231	373	6,239	0,1082	1,949	112,4
287	463	6,134	0,1902	3,100	110,5
562	905	5,928	0,2199	3,710	106,8

Tab. 5. Einfluß von Bilirubin auf die Glucose-Bestimmung (N = 5). Das Bilirubin wurde in Carbonat-Lösung aufgelöst und einem Serum zugesetzt.

Bilirubin-Konzentration		Glucose-Konzentration			
mg/100 ml	mmol/l	mmol/l			mg/100 ml
		\bar{X}	s		
0					
2,39	41,0	5,759	0,0833		103,8
3,21	54,9	5,704	0,1144		102,8
6,98	119,4	5,842	0,0531		105,3
11,65	199,2	5,745	0,0717		103,5
16,43	280,9	5,773	0,0453		104,0
20,82	355,6	5,718	0,0785		103,0

³⁾ EC 1.1.1.44

Physikalische Interferenzen

Es ist bekannt, daß das Vorliegen einer Lipämie selbst dann, wenn eine Enteiweißung vorgenommen wird, auch bei der Hexokinase-Methode zu beträchtlichen Fehlern führen kann (20). Wir untersuchten daher mehrere lipämische Seren vor und nach einer Klärung durch Zentrifugation während 20 min bei 15 000 g (26). Einige dieser Resultate sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Wie aus diesen Beobachtungen hervorgeht, stört das Vorliegen einer Lipämie die Glucose-Bestimmung mit dem GSA II nicht. Ebenfalls negative Resultate wurden mit Albumin (Tab. 7) erhalten. Alle diese Beobachtungen weisen auf die große Bedeutung des Mitführens geeigneter Leerwerte bei mechanisierten Bestimmungen hin.

Beeinflussung

Die Möglichkeit einer Beeinflussung der Resultate durch Verschleppung wurde mit einer früher beschriebenen Versuchs-Anordnung überprüft (25, 31). Die Resultate dieses Experimentes sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tab. 6. Glucose-Bestimmungen in lipämischen und durch Zentrifugation geklärten Seren, (15 000 g, 20 min)

Patient	Triglyceride mg/100 ml	Cholesterin mg/100 ml	Glucose mg/100 ml	
			vor Klärung	nach Klärung
S. V.	420	268	289	290
M. V.	307	179	86	91
K. B.	990	386	20	22
L. W.	1812	555	166	150
S. A.	585	256	102	103
P. E.	3510	323	72	79
T. D.	981	248	70	76
B. E.	390	1028	94	92
S. E.	303	324	87	86

Tab. 7. Einfluß von Protein auf die Glucose-Konzentration (N = 10). Als Ausgangs-Lösungen diente eine 20 g/l Albumin-Lösung und eine wäßrige Glucose-Lösung (195 mg/100 ml). Die einzelnen Ansätze wurden durch Mischung hergestellt.

Protein-Konzentration g/100 ml	Glucose-Konzentration		
	mg/100 ml	s	V. K. (%)
	\bar{X}		
0	97,70	0,709	0,726
1	96,10	1,039	1,081
2	96,60	0,919	0,951
3	97,10	1,000	1,030
4	96,80	1,131	1,168
5	96,20	1,060	1,102
6	96,30	0,956	0,993
7	96,90	0,824	0,850
8	97,20	1,028	1,058
9	97,00	0,927	0,956
10	96,70	0,858	0,887

Tab. 8. Versuch zum Nachweis einer Verschleppung. Es wurden 10 Versuchsreihen durchgeführt.

Die prozentuale Verschleppung (E) wurde wie folgt berechnet:

$$E (\downarrow) = \frac{t_1 - t_5}{h_5 - t_5} \quad \text{und} \quad E (\uparrow) = \frac{h_5 - h_1}{h_5 - t_5}$$

Reihe	t_1	t_5	h_1	h_5	$E (\downarrow)$	$E (\uparrow)$
1	13,0	14,0	200,0	201,0	-0,0053	0,0053
2	12,0	13,0	197,0	201,0	-0,0053	0,0213
3	11,0	13,0	200,0	200,0	-0,0107	0
4	13,0	12,0	200,0	200,0	0,0053	0
5	12,0	12,0	202,0	199,0	0	-0,0160
6	12,0	12,0	198,0	200,0	0	0,0106
7	12,0	13,0	200,0	200,0	-0,0053	0
8	12,0	12,0	201,0	199,0	0	-0,0107
9	12,0	14,0	201,0	200,0	-0,0107	-0,0054
10	12,0	11,0	202,0	199,0	0,0053	0,0160
\bar{X}	12,1	12,6	200,1	199,9	-0,0027	0,0011

Ähnlich wie bei den Untersuchungen über die Möglichkeit einer Verschleppung bei der Harnstoff-Bestimmung (26) war es auch im vorliegenden Fall nicht möglich, eine Verschleppung bei einem Konzentrations-Gefälle von 200 auf 12 mg/100 ml nachzuweisen.

Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde zunächst durch Vergleichs-Bestimmungen mit einigen kommerziellen Kontroll-Seren ermittelt. Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, war die Übereinstimmung vor allem mit den enzymatisch bestimmten Werten gut.

Als nächstes wurden je 100 echte (blinde) Doppelbestimmungen mit einer manuellen Methode (8; 9) und dem GSA durchgeführt. Die Resultate sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Bei einem arithmetischen Mittel von 107,3 mg/100 ml betrug die Standard-Abweichung 2,15 mg/100 ml bei der manuellen Methode; dies entspricht einem Variations-Koeffizienten von 2%. Beim GSA II lag das arithmetische Mittel bei 107,55 mg/100 ml, die Standard-Abweichung zwischen den Doppel-Werten bei 0,896 mg/100 ml; der Variations-Koeffizient zwischen den Mitteln der Doppel-Bestimmungen betrug 0,833%.

Zusammen mit den früher erwähnten Untersuchungen mit eingewogenen Substanzen bestätigen die erwähnten Beobachtungen die hohe Richtigkeit der Methode.

Präzision

In einer vorangehenden Arbeit (26) führten wir die Begriffe der apparativen und methodischen Präzision ein. Zur Beurteilung der Summe dieser beiden Fehler-Gruppen eignet sich die in Abbildung 4 gewählte Darstellung. Ausgewertet wurden die in Tabelle 1 angeführten Daten. Auf die Abszisse sind die Glucose-Konzentrationen, bzw. die Absorbanz bei den gewählten Konzentrationen dargestellt. Bei jeder Konzentration wurden 10 Bestimmungen durchgeführt. Die Ordinate

Tab. 9. Bestimmung der Glucose-Konzentration in kommerziellen Kontroll-Seren (Resultate in mg/100 ml, N = 5)

Serum	Art*)	Deklarierte Werte Methode	Gefundene Werte		V. K. (%)
			\bar{X}	$\pm 2s$	
Precinorm S ¹⁾	L	HK/G-6-P-DH	106	95,4 – 117	1,05
		GOD-Perid (Boehringer)	107	96,3 – 118	
		GOD-o-Dianisidin	109	98,1 – 120	
		o-Toluidin	109	98,1 – 120	
Patho-trol ²⁾	F	HK/G-6-P-DH	257		0,50
		GOD-o-Dianisidin	275		
		o-Toluidin	255	245 – 265	
		AutoAnalyzer (N-2a)	272	262 – 282	
		Nelson-Somogyi	276	266 – 286	
Lab-Trol ²⁾ (40 A-Z)	F	HK/G-6-P-DH	93	87 – 99	0,88
		GOD-Perid (Boehringer)	100	94 – 106	
		GOD-o-Dianisidin	95	99 – 111	
		o-Toluidin	92	86 – 98	
		AutoAnalyzer (N-2b 1/11)	100	92 – 108	
		Nelson-Somogyi	97	92 – 103	
Moni-trol I ²⁾ (LTD-114 A, B)	L	HK/G-6-P-DH	87	81 – 93	1,20
		GOD-Perid (Boehringer)	88	82 – 94	
		GOD-o-Dianisidin	91	85 – 96	
		o-Toluidin	100	94 – 106	
		AutoAnalyzer (N-2b 1/11)	95	87 – 103	
		SMA 12/60	101	88 – 114	
Moni-trol II ²⁾ (PTD-27 A)	L	HK/G-6-P-DH	233	221 – 245	0,54
		GOD-Perid (Boehringer)	225	217 – 233	
		GOD-o-Dianisidin	255	239 – 271	
		o-Toluidin	232	223 – 241	
		AutoAnalyzer (N-2b 1/11)	240	233 – 247	
		SMA 12/60	251	237 – 265	

*) F flüssig L lyophilisiert

1) Boehringer, Mannheim

2) Dade, USA

HK/G-6-P-DH = Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

GOD = Glucoseoxidase

Tab. 10. Vergleichs-Doppel-Bestimmungen mit einer manuellen Methode (Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und dem GSA II. Resultate in mg/100 ml

Methode	Manuell	GSA II
N	2 · 100	2 · 100
\bar{X}	107,258	107,551
\bar{X}_{Diff}	2,2424	0,9192
s_{Diff}	2,1485	0,8961
V. K. (%)	2,001	0,833

zeigt die Standard-Abweichungen der Resultate – ebenfalls die Absorbanz – bei den einzelnen Konzentrationen. Es ergibt sich eine Fehler-Gerade mit der Regression

$$s = 0,00126 + 0,00242 \text{ dA},$$

einer Standard-Abweichung von 0,00114 und einem Korrelations-Koeffizienten von 0,71287. Die Kurven

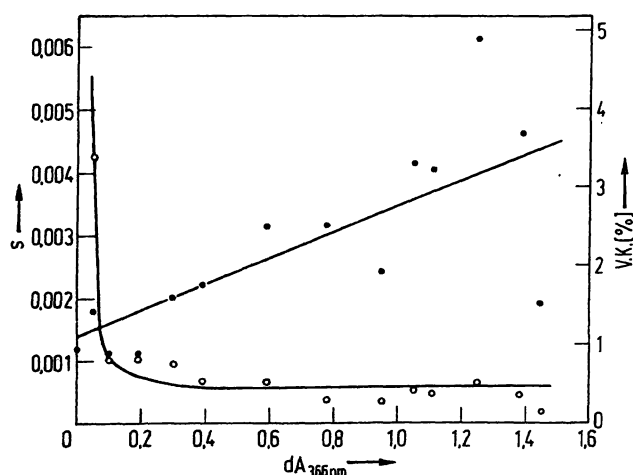


Fig. 4. Graphische Darstellung der in Tabelle 1 angeführten Versuche. Abszisse: Absorbanz, Ordinate: zugehörige Standard-Abweichungen (•, links) und Variations-Koeffizienten (○, rechts).

entsprechen absolut denjenigen bei der Harnstoff-Bestimmung (26). Der Variations-Koeffizient hat die höchsten Werte bei einer Absorbanz um null und fällt kontinuierlich auf Werte unter 1%.

Die Repetierbarkeit der Methode geht aus mehreren der oben angeführten Experimente hervor. Sie ist primär eine Funktion der Absorbanz und liegt in Prozent ausgedrückt bei einer Absorbanz über 0,15 unter 1%.

Die Reproduzierbarkeit wurde auf Grund einiger Daten einer Qualitäts-Kontrolle während drei Monaten ermittelt. Verwendet wurden drei Pool-Seren, die in einzelne Röhrchen abgefüllt und tief gefroren aufbewahrt wurden. Täglich wurde einmal je ein Röhrchen untersucht. Die Resultate sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Dabei muß berücksichtigt werden, daß

1. keine Justierungen vorgenommen wurden, nachdem der GSA II im Januar 1973 mit der Initial-Justierung eingestellt worden war und
2. die Reagenzien immer nur dann nachgefüllt wurden, wenn die Füllstand-Anzeige vor einem Ausgehen warnte.

Bei tiefen Glucose-Konzentrationen (um 35 mg/100 ml) lag der Variations-Koeffizient um 4%, bei mittleren Konzentrationen (um 140 mg/100 ml) um 1,5% und bei hohen Konzentrationen (um 290 mg/100 ml) um 1,2%. Versuche über die Repetierbarkeit und die Reproduzierbarkeit unterscheiden sich beim GSA II praktisch nur dadurch, daß im ersten Fall Proben aus einem einzigen Röhrchen untersucht werden während bei der Reproduzierbarkeit täglich ein anderes Röhrchen zur Untersuchung kam. Da nach den wenigen vorhandenen Angaben (31) die Unterschiede zwischen verschiedenen Specimen zur Qualitäts-Kontrolle in der Größen-Ordnung von 1% liegen, darf wohl der Schluß gezogen werden, daß die beobachteten Unterschiede zwischen Repetierbarkeit und Reproduzierbarkeit durch das Untersuchungsmaterial bedingt waren.

Qualitätskontrolle und praktische Erfahrungen

Die vorliegende Methode ist seit Januar 1973 während 24 h täglich im Routine-Einsatz. Nach einer anfänglichen Prüfphase wurde die Qualitätskontrolle auf ein Mini-

Tab. 11. Resultate einer Qualitäts-Kontrolle während 3 Monaten. Verwendung von 3 Kontroll-Seren. Täglich je eine Bestimmung in einem frisch aufgetauten Röhrchen. Alle Resultate in mg/100 ml.

	April	Mai	Juni
Specimen I			
N	23	25	29
\bar{X}	286,0	293,8	292,8
s	4,2	3,37	3,88
V. K. (%)	1,47	1,15	1,33
Specimen II			
N	23	25	29
\bar{X}	35,7	36,0	36,5
s	2,0	1,4	1,5
V. K. (%)	5,6	3,9	4,0
Specimen III			
N	23	25	29
\bar{X}	141,0	143,8	144,4
s	1,59	2,41	2,13
V. K. (%)	1,13	1,68	1,48

mum reduziert. Sie beschränkt sich heute auf eine täglich zweimal durchgeführte Null-Kontrolle (mit einer 0,01 mol/l Essigsäure-Lösung) und einer Aktivitäts-Kontrolle (mit einer wäßrigen oder protein-haltigen Lösung mit einer Glucose-Konzentration um 200 mg/100 ml). Alle weitergehenden Überwachungen haben sich als überflüssig erwiesen. Die Stabilität der Reagenzien war ausgezeichnet. Es kam bisher noch nie vor, daß ein Reagenz weggeworfen werden mußte. Es wurde daher immer nur dann Reagenz nachgefüllt, wenn die Füllstands-Anzeige den Übergang auf das Reserve-Volumen anzeigte.

Danksagung

Die Untersuchungen wurden z. T. durch die Fa. Greiner Electronic AG, Langenthal, unterstützt. Für ihre wertvolle Mitarbeit danken wir Frl. M. L. Christensen, Frl. M. Lehmann und Frl. R. Takkinen.

Literatur

1. Slein, M. W., Cori, G. T. & Cori, C. F. (1950), J. Biol. Chem. 186, 763–780.
2. Hohorst, H. J., Kreutz, F. H. & Bücher, T. (1959), Biochem. Z. 332, 18–46.
3. Schmidt, F. (1962), Klin. Wochenschr. 40, 585–589.
4. Barthelmai, W. & Czok, R. (1962), Klin. Wochenschr. 40, 585–589.
5. Stork, H. & Schmidt, F. H. (1968), Klin. Wochenschr. 46, 789–790.
6. Haackel, R. (1970) diese Z. 8, 480–482.
7. Fonseca-Wollheim, F., da (1971), diese Z. 9, 497–502.
8. Richterich, R. & Dauwalder, H. (1971), Schweiz. Med. Wochenschr. 101, 615–618.
9. Richterich, R. (1971), Klinische Chemie, Theorie und Praxis, 3. Aufl., S. 265–278. Karger, Basel.
10. Schubert, G. E. (1964), Klin. Wochenschr. 42, 619–622.
11. Renschler, H. E., Weicker, H. & von Baeyer, H. (1965), Deut. Med. Wochenschr. 90, 2349–2353.
12. Keller, D. M. (1965), Clin. Chem. 11, 471–477.
13. Peterson, I. J. (1968), Clin. Chem. 14, 513–520.
14. Peterson, I. J. & Young, D. S. (1968), Analyt. Biochem. 23, 301–316.

15. Koenig, R., Dauwalder, H. & Richterich, R. (1971), Schweiz. Med. Wochenschr. 101, 860–866.
16. Schersten, B. & Tibbling, G. (1968), Clin. Chem. 14, 243–252.
17. Harding, U. & Heinzel, G. (1969), diese Z. 7, 640–643.
18. Yee, H. Y. (1972), Clin. Chem. 18, 1416–1419.
19. Neeley, W. E. (1972), Clin. Chem. 18, 509–515.
20. Haeckel, R. & Haeckel, H. (1972), diese Z. 10, 453–461.
21. Schmitt, A., Keller, I. & Ringhardt, I. (1972), Beiträge zur Klinischen Chemie, Heft 8 (Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH).
22. Greiner, R. (1973), diese Z. 11, 76–86.
23. Richterich, R. & Greiner, R. (1971), Automated Multiphasic Health Testing, S. 124–127. Engineering Foundation, New York.
24. Richterich, R. (1973), Ärtzl. Lab. 19, 300–305.
25. Richterich, R. & Ehrenguber, H. (1968), Clin. Chim. Acta 22, 417–422.
26. Richterich, R. & Küffer, H. (1972), diese Z. 11, 553–564.
27. Kornberg, A. & Horecker, B. L. (1953), Biochemical Preparations New York: Wiley, 3, 24.
28. Pfeleiderer, G., Jeckel, D. & Wieland, T. (1956), Biochem. Z. 328, 187–194.
29. Siegel, J. M., Montgomery, B. A. & Bock, R. M. (1959), Arch. Biochem. Biophys. 82, 288–299.
30. Richterich, R., Greiner, R. & Küffer, H. (1973), diese Z. 11, 65–75.
31. Pastor, J., Pauli, A. M., Orinier, M., Garde, J. F., Desvenine, J. & Dumoulin, B. (1973), Organisation des Laboratoires, Biologie prospective, (G. Siest, ed.) p. 415–423, L'expansion scientifique Française, Paris.

Dipl. Biochem. H. Küffer
Chemisches Zentrallabor
Inselspital
CH-3010 Bern/Schweiz